

**SEPARATION COLUMN**

**Patent number:** JP2002350413  
**Publication date:** 2002-12-04  
**Inventor:** OKAMOTO YOSHIO; BEZHAN CHANKVETADZE;  
YAMAMOTO TOMOYO; WAKITA TSUNEKI  
**Applicant:** DAICEL CHEM  
**Classification:**  
**- International:** G01N30/48; C07B57/00; C07C33/46; C07C39/15;  
C07C49/657; C07C49/92; C07D301/32; C07D303/04;  
C07D303/48; C07D487/08; G01N27/447; G01N30/88;  
C07M7/00  
**- european:**  
**Application number:** JP20010155232 20010524  
**Priority number(s):** JP20010155232 20010524

**Report a data error here**

**Abstract of JP2002350413**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a separation column having stable frit producible easily with excellent reproducibility, and a separation method of an optical isomer by using the column.

**SOLUTION:** This separation column is characterized by having the frit acquired by dehydration condensation reaction of alkoxy silane. A manufacturing method of the separation column for performing the dehydration condensation reaction in the column where alkoxy silane solution is introduced is also provided. The separation method of the optical isomer is characterized by separating the optical isomer by using the separation column.

---

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2002-350413  
(P2002-350413A)

(43) 公開日 平成14年12月4日 (2002.12.4)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード*(参考)
G 0 1 N 30/48		G 0 1 N 30/48	K 4 C 0 4 8 N 4 C 0 5 0 W 4 H 0 0 6
C 0 7 B 57/00	3 4 0 3 4 3	C 0 7 B 57/00	3 4 0 3 4 3
審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 7 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2001-155232(P2001-155232)	(71)出願人	000002901 ダイセル化学工業株式会社 大阪府堺市鉄砲町1番地
(22)出願日	平成13年5月24日(2001.5.24)	(72)発明者	岡本 佳男 愛知県名古屋市東区矢田町2-66-222
		(72)発明者	ベツアン・チャンクベターゼ ジョージア共和国トビリシ380028, チャフ チャパーズ・アフ・1, トビリシ・ステイ ト・ユニバーシティ, デパートメント・オ ブ・ケミストリー
		(74)代理人	100063897 弁理士 古谷 馨 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分離用カラム

(57) 【要約】

【課題】 再現良く、簡易に製造でき、安定性に富むフリットを持った分離用カラム及びそれを用いた光学異性体の分離方法の提供。

【解決手段】 アルコキシシランの脱水縮合反応により得られるフリットを有することを特徴とする分離用カラム、アルコキシシラン溶液を導入したカラム内で脱水縮合反応を行う分離用カラムの製造方法、及びこの分離用カラムを用い、光学異性体を分離することを特徴とする光学異性体の分離方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 アルコキシシランの脱水縮合反応により得られるフリットを有することを特徴とする分離用カラム。

【請求項2】 内部に充填剤が保持されていることを特徴とする請求項1記載の分離用カラム。

【請求項3】 充填剤が光学分割用充填剤であることを特徴とする請求項1又は2記載の分離用カラム。

【請求項4】 充填剤が多糖誘導体からなることを特徴とする請求項3記載の分離用カラム。

【請求項5】 高速液体クロマトグラフィー用カラムであることを特徴とする請求項1～4のいずれか一項に記載の分離用カラム。

【請求項6】 キャピラリー電気泳動法に用いられるカラムであることを特徴とする請求項1～4のいずれか一項に記載の分離用カラム。

【請求項7】 アルコキシシラン溶液を導入したカラム内で脱水縮合反応を行うことを特徴とする請求項1～6のいずれか一項に記載の分離用カラムの製造方法。

【請求項8】 請求項1～6のいずれか一項に記載の分離用カラムを用い、光学異性体を分離することを特徴とする光学異性体の分離方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は分離分析手段である、液体クロマトグラフィー法、キャピラリー電気泳動法、ガスクロマトグラフィー法等に用いられる分離用カラム、その製造方法及びそれを用いた光学異性体の分離方法に関するものである。特に、高感度、微量、迅速分析を可能とする、優れた光学異性体分離用カラムに関するものである。

## 【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】多くの有機化合物には光学異性体が存在するが、これら光学異性体の物理的、化学的性質、例えば沸点、融点、溶解度などの物性は全く同一である。しかしながら光学異性体間には生理活性の点でしばしば差異が見られることが広く知られている。このために医薬品の分野においては光学異性体間でその薬効、毒性の点で顕著な差が見られる場合がしばしばあり、香料、食品添加物においても、匂い、味の点で差異の見られる場合がある。

【0003】このような社会的な要請のもと、光学異性体の片方のみを製造する手段が広く検討されているが、同時に光学異性体を分析する技術も研究され進展してきた。先に述べたように光学異性体の物理的、化学的性質は全く同一であるために、通常の沸点や溶解度、分配係数、電荷の大きさといった物性の違いによって分離を行う手段では分析が行えない。

【0004】そこで光学異性体間の立体的な配置を室温に近い条件で識別（不斉識別）することが可能な光学異

性体の分離、分析手段として高速液体クロマトグラフィー（HPLC）法による光学異性体分離方法が進展してきた。ここで用いているHPLC用カラムとは不斉識別剤そのもの、あるいは不斉識別剤を適当な担体上に担持させたキラル固定相が使用されている。例えば、光学活性ポリメタクリル酸トリフェニルメチル（特開昭57-150432号）、セルロース、アミロース誘導体（Y. Okamoto, M. Kawashima and K. Hatada, J. Am. Chem. Soc., 106, 5337, 1984）、オボムコイド（特開昭63-307829号）等が開発されている。これらHPLC用キラル固定相の中でも、セルロース誘導体やアミロース誘導体をシリカゲル上に担持させた光学分割カラムは、非常に幅広い化合物に対し、高い不斉識別能を有することが知られている。

【0005】しかしながらこれらHPLC法において、分離の際にある程度の量（約0.1μg以上）の試料が必要であるが、上述した生体成分、代謝研究等の分野で用いるには、試料の絶対量が極めて微量であるため、例えば10～0.1pgの試料が精度高く分析出来る手法が望まれている。またHPLC法では移動相溶剂量が多量に排出されることから、これらの溶剂量の削減が環境問題の点から指摘されている。

【0006】また、近年HPLC法とは分離手法の異なるキャピラリー電気泳動法（CE）による光学分割技術の研究が進められている。キャピラリー電気泳動法とは、キャピラリーと呼ばれる細管を用い、両端に電圧を印加することで、電荷、サイズなどの違いにより試料を分離する技術である。従来、CE法を用いた光学分割法は泳動液中にシクロデキストリンやその誘導体を添加して行うCZE（キャピラリーゾーン電気泳動）法、MEKC（ミセル動電クロマト）法が良く知られている（Journal of Chromatography A, 659, (1994) 449）。またシクロデキストリン以外にもヘパリン（Anal. Chem., 66(1994), 3054）、硫酸化多糖類であるガラクトサミン、グルクロン酸、フコース（特開平9-143202号）、デキストラン等（Journal of Chromatography A, 735, (1996) 345）を泳動液に添加した例が報告されている。

【0007】キャピラリーカラムの製造方法には高度な技術を要する。特に、キャピラリー内に充填剤を保持するためのフリットの作製技術が問題となり、キャピラリー電気泳動法では、これが通電を遮断する気泡の問題に関係してくる。

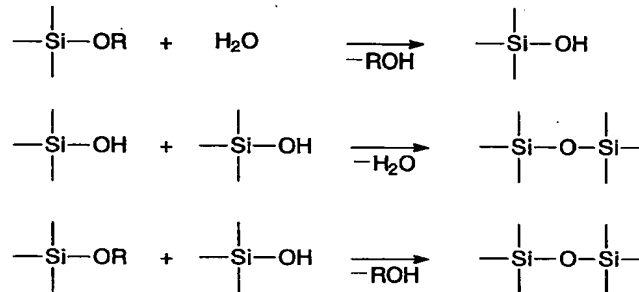
【0008】従来、フリットの作製にはシリカゲル又はその誘導体を焼結させる方法が用いられていたが、フリットの長さの調整が困難な上、加熱部分が折れやすく作製には高度な技術を要した。そのため、フリット作製を不要とするフリットレスカラムの研究も行われている（Anal. Chem., vol. 68, No. 17, 2753-2757, 1996, Electrophoresis, vol. 20, No. 1, 43-49, 1999, Anal. Chem., vol. 72, No. 15, 3605-3610, 2000, Chromatography, vol. 21, No. 3, 195-202, 2000）。

【0009】本発明の目的は、再現良く、簡易に製造でき、安定性に富むフリットを持った分離用カラム及びそれをを用いた光学異性体の分離方法を提供することである。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記の課題を解決するべく鋭意検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

【0011】すなわち本発明は、アルコキシシランの脱水縮合反応により得られるフリットを有することを特徴とする分離用カラム、アルコキシシラン溶液を導入した\*



(1)

【0014】ここで、Rは無置換又は置換基を有していてもよい芳香族炭化水素基、水素原子、炭素数1～20のアルキル基から選ばれる少なくとも1種である。本発明で用いられる好ましいアルコキシシランとしては、テトラメトキシシラン、テトラエトキシシラン、トリメトキシシラン、トリエトキシシラン、フェニルトリメトキシシランなどが挙げられる。また、アルコキシシラン単体のみならず、例えばエチレングリコールなどの二価アルコールやエステル類などと共重合させてもよい。

【0015】このようなアルコキシシランの脱水縮合反応により、三次元架橋したマトリックスが形成され、これが本発明のフリットとなる。かかるフリットを有する本発明のカラムを製造するには、あらかじめ適当な溶媒中でアルコキシシラン溶液を調製した後、この溶液をカラム内に導入し、0℃から180℃で脱水縮合反応を行うのが好ましい。

【0016】アルコキシシラン溶液の調製に用いられる溶剤としては、水、アセトン、メチルエチルケトン、アセトフェノン等のケトン系溶剤、酢酸エチル、酢酸メチル、酢酸プロピル、プロピオン酸メチル、安息香酸メチル、酢酸フェニル等のエステル系溶剤、テトラヒドロフラン、1, 4-ジオキサン、ジエチルエーテル、tert-ブチルメチルエーテル等のエーテル系溶剤、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド等のアミド系溶剤、N, N-ジメチルイミダゾリジノン等のイミド系溶剤、クロロホルム、塩化メチレン、四塩化炭素、1, 2-ジクロロエタン等のハロゲン系溶剤、ペンタン、石油エーテル、ヘキサン、ヘプタン、オクタ

\*カラム内で脱水縮合反応を行う分離用カラムの製造方法、及びこの分離用カラムを用い、光学異性体を分離することを特徴とする光学異性体の分離方法である。

【0012】

【発明の実施の形態】本発明におけるアルコキシシランの脱水縮合反応は、式(1)に示すような、シリケートの加水分解とそれに続くシラノール基の縮合反応という素反応からなる。

【0013】

【化1】

ン、ベンゼン、トルエン、キシレン、メシチレン等の炭化水素系溶剤、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール等のアルコール系溶剤、ジエチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン等のアミン系溶剤が挙げられ、これらの溶剤は単独でも2種以上の混合溶剤として用いてもよい。更に加水分解触媒として、酢酸、塩酸、硫酸等の酸、又はアンモニウム、水酸化ナトリウム等の塩基を添加し、アルコキシシラン溶液の調製用溶剤とする。アルコキシシラン溶液中のアルコキシシランの濃度は0.05～5重量%が好ましい。

【0017】カラム内へのアルコキシシラン溶液の導入量は特に制限はないが、カラム中のアルコキシシラン溶液部分の長さが0.2～4cm、更には0.5～2cmとなるように導入するのが好ましい。

【0018】本発明に用いられるカラムは通常使用されるものであれば特に限定されないが、カラムの内径は1～5000μmが好ましく、10～1000μmが更に好ましく、10～200μmが特に好ましい。またカラムの長さはいかなる長さでも良いが、20～100cmが好ましい。

【0019】カラムの材質は液体クロマトグラフィーや電気泳動分析の使用に供されるものであれば特に限定されないが、特にガラスないしはシリカを含む材質が望ましく、現在電気泳動で多用されている熔融シリカ製のキャピラリーカラムが最も好ましい。

【0020】本発明のカラムは、内部に充填剤が保持されていることが好ましく、本発明に用いられる充填剤は、分析の目的に応じていかなるものも使用することができるが、光学分割用充填剤、特に多糖誘導体からなる

充填剤を用いるのが好ましい。

【0021】本発明に用いられる多糖誘導体を構成する多糖とは、合成多糖、天然多糖及び天然物変成多糖のいずれかを問わず、光学活性であればいかなるものでもよいが、好ましくは結合様式の規則性の高いものが望ましい。例示すれば $\beta$ -1, 4-グルカン（セルロース）、 $\alpha$ -1, 4-グルカン（アミロース、アミロペクチン）、 $\alpha$ -1, 6-グルカン（デキストラン）、 $\beta$ -1, 6-グルカン（ブツラン）、 $\beta$ -1, 3-グルカン（例えばカードラン、シゾフィラン等）、 $\alpha$ -1, 3-グルカン、 $\beta$ -1, 2-グルカン（Crown Gall多糖）、 $\beta$ -1, 4-ガラクトサン、 $\beta$ -1, 4-マンナン、 $\alpha$ -1, 6-マンナン、 $\beta$ -1, 2-フラクタン（イヌリン）、 $\beta$ -2, 6-フラクタン（レバン）、 $\beta$ -1, 4-キシラン、 $\beta$ -1, 3-キシラン、 $\beta$ -1, 4-キトサン、 $\alpha$ -1, 4-N-アセチルキトサン（キチン）、プルラン、アガロース、アルギン酸等であり、アミロースを含有する澱粉も含まれる。これらの中では、高純度の多糖を容易に入手できるセルロース、アミロース、 $\beta$ -1, 4-キシラン、 $\beta$ -1, 4-キトサン、キシラン、 $\beta$ -1, 4-マンナン、イヌリン、カードラン等が好ましく、特にセルロース、アミロースが好ましい。

【0022】これら多糖の数平均重合度（1分子中に含まれるピラノースあるいはフラノース環の平均数）は好ましくは5以上、更に好ましくは10以上であり、特に上限はないが、500以下であることが取り扱いの容易さの点で望ましい。

【0023】本発明に用いられる多糖誘導体としては、上記のような多糖の水酸基の一部に該水酸基と反応する官能基を有する化合物を、従来公知の方法でエステル結合、ウレタン結合、あるいはエーテル結合等させることにより誘導体化して得られる化合物が挙げられる。ここで水酸基と反応する官能基を有する化合物としては、イソシアン酸誘導体、カルボン酸、エステル、酸ハライド、酸アミド、ハロゲン化物、エポキシ化合物、アルデヒド、アルコール、あるいはその他脱離基を有する化合物であればいかなるものでもよく、これらの脂肪族、脂環族、芳香族、ヘテロ芳香族化合物等、更には硝酸等の無機酸を用いることができる。特にエステル誘導体又はカルバメート誘導体が好ましい。

【0024】多糖誘導体は、下記に記載する担体に担持させる方法、多糖誘導体自身を破碎、あるいは球状粒子化する方法等のいずれの方法によってもカラムに充填することができる。

【0025】ここでいう担持とは、担体上に多糖誘導体が固定化されていることであり、その方法は多糖誘導体と担体との間の物理的な吸着、担体との間の化学結合、多糖誘導体同士の化学結合、第三成分の化学結合、多糖誘導体への光照射、ラジカル反応などいかなる方法でも

良い。さらにここでいう担体とは、多孔質有機担体又は多孔質無機担体があげられ、好ましくは多孔質無機担体である。特に好ましい担体としてシリカゲルがあげられ、その表面は残存シラノールの影響を排除するために表面処理が施されていることが好ましいが、全く表面処理が施されていないでも問題ない。

【0026】これらの充填剤の中では、重合性官能基を有する担体、重合性官能基を有する多糖誘導体及び重合性モノマーを重合反応させて、これら3者間で化学結合を形成させたものが好ましい。

【0027】担体に導入する重合性官能基としてはラジカル重合、アニオン重合、カチオン重合、重縮合などの重合反応に関与することのできる官能基であれば、いかなるものでも良いが、アクリル酸誘導体、メタクリル酸誘導体、スチレンなどに代表されるビニル基がより望ましい。

【0028】多糖誘導体に導入する重合性官能基としてはラジカル重合、アニオン重合、カチオン重合、重縮合などの重合反応に関与することのできる官能基であれば、いかなるものでも良いが、アクリル酸誘導体、メタクリル酸誘導体、スチレンなどに代表されるビニル基がより望ましい。多糖誘導体へ導入される重合性官能基の割合は、ピラノースあるいはフラノース環の3個の水酸基の置換度として0.01から2.9の官能基置換度が好ましく、0.1から1.5が更に好ましい。

【0029】重合性モノマーとしてはラジカル重合、アニオン重合、カチオン重合、重縮合などの重合反応に関与することのできるモノマーであればいかなるものでも良いが、より好ましくはアクリル酸誘導体、メタクリル酸誘導体、スチレンなどに代表されるビニルモノマーである。

【0030】本発明の分離用カラムは、液体クロマトグラフィー用カラム、特に高速液体クロマトグラフィー用カラムとして有用であり、この液体クロマトグラフィー法に用いる移動相は、水系、有機溶剤系のいずれのものでも構わない。

【0031】また本発明のキャピラリーカラムは、液体クロマトグラフィー法のみならず、ガスクロマトグラフィー、電気泳動用、特にキャピラリーエレクトロクロマトグラフィー用（CEC用）、CZE（キャピラリーゾーン電気泳動）法、MEKC（ミセル動電クロマト）法のキャピラリーカラムとしても使用することができる。

【0032】本発明の分離用カラムを用いると、各種光学異性体を効率よく分離することができる。

【0033】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0034】実施例1：フリットを有するキャピラリーカラムの製造

内径75 $\mu$ m、長さ18.5cmのフューズドシリカキャピラリーカラムに対してアルカリ前処理後、希塩酸、イオン交換水を通液し、よく洗浄後、アセトン通液後、乾燥窒素の通気により乾燥した。

【0035】酢酸水溶液(0.01M) 1ml中にポリエチレングリコール(平均分子量約10,000) 100mg、テトラメトキシシラン0.45mlを加えて氷浴中で30分間攪拌した。その後、超音波により脱気し、上記のキャピラリーカラムに1cmの長さになるまで導入した。両端をシリコンゴムで閉じ、40℃で一晩反応させた。反応後、蒸留水で洗浄し、50℃で加熱し、フリットを有するキャピラリーカラムを得た。

【0036】実施例2：内部に充填剤が保持されているフリットを有するキャピラリーカラムの製造

窒素雰囲気下、セルロース(商品名アビセル、メルク社製) 10gに乾燥ピリジン200mlを加え、これに塩化トリフェニルメチル(塩化トリチル) 20.6gを加えて115℃で24時間の加熱・攪拌を行った後、メタノール3Lへ注ぎ込み、6位がトリチル化されたセルロース誘導体を得た。

【0037】この6-トリチルセルロース10gを乾燥ピリジン150mlに溶解後、3,5-ジクロロフェニルイソシアネート18.6gを加えて115℃で48時間の加熱・攪拌を行った後、メタノール3Lへ注ぎ込み、6位がトリチル化され2,3位が3,5-ジクロロフェニルカルバメート化されたセルロース誘導体を得た。得られた6-トリチル-2,3-ビス(3,5-ジクロロフェニルカルバメート)セルロース10gをメタノール1Lと濃塩酸0.25gの混合溶液に添加し、12時間、室温で攪拌後、濾取し、6位のトリチル基を除去した6-ヒドロキシ-2,3-ビス(3,5-ジクロロフェニルカルバメート)セルロースを得た。

【0038】これを5gとり乾燥ピリジン70mlに溶解後、4-ビニルフェニルイソシアネート405mgを加えて115℃で24時間の加熱・攪拌を行った後、3,5-ジクロロフェニルイソシアネート1.05gを添加し、さらに115℃で24時間の加熱・攪拌を行った。反応混合物を2Lのメタノールに注ぎ込み、目的の6位の一部に重合性ビニルフェニルカルバメートが導入されたセルロース3,5-ジクロ

ロフェニルカルバメート誘導体(以下CVDCPCという)を得た。重合性ビニルフェニルカルバメートの置換度は0.25である。

【0039】従来の表面処理法によりビニル基を導入したシリカゲル(粒径3 $\mu$ m、孔径1000Å)上で、CVDCPC 64mgとスチレン6.4mgをテトラヒドロフラン(THF) 0.9mlに溶解させ、これに2.78mgの2,2'-アゾビスイソブチロニトリル(AIBN)/THF(1.0ml)溶液を加え、60℃で20時間の重合反応を行い、充填剤を得た。

10 【0040】この充填剤10mgを、ヘキサノ-イソプロパノール(9:1) 1mlに分散させ、実施例1で作成したフリットを有するカラムに、400kg/cm<sup>2</sup>の圧力で充填して、充填剤が保持されているフリットを有するキャピラリーカラムを得た。

【0041】実施例3

内径75 $\mu$ m、長さ18.5cmのフューズドシリカキャピラリーカラムの代わりに、内径100 $\mu$ m、長さ25.0cmのフューズドシリカキャピラリーカラムを用いる以外は、実施例1及び2と同様にして、充填剤が保持されているフリットを有するキャピラリーカラムを得た。

【0042】実施例4

実施例2及び3で得られたキャピラリーカラムを用い、Prince capillary electrophoresis instrument (Lauer labs, Emmen, The Netherlands)システム、検出器としてJASCO CE 971 UV Intelligent(日本分光社製)を用い、以下に示す7種のラセミ体(a)~(g)について、下記条件で光学分割を行った。その結果を表1に示す。なお、表1において、分離係数( $\alpha$ )は、以下の式で定義される。

30

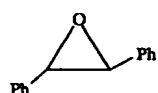
【0043】 $\alpha = k_2' / k_1'$

ここで、 $k_1'$ はより弱く保持される光学異性体の保持係数、 $k_2'$ はより強く保持される光学異性体の保持係数を示す。

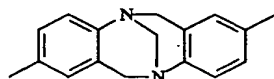
【0044】

【化2】

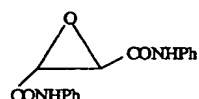
9



ラセミ体 (a)

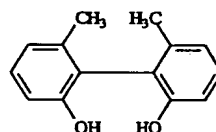


ラセミ体 (d)

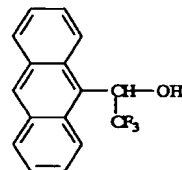


ラセミ体 (g)

(6)

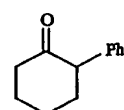


ラセミ体 (b)

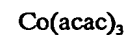


ラセミ体 (e)

10



ラセミ体 (c)



ラセミ体 (f)

【0045】移動相：ヘキサン／イソプロパノール＝9  
／1 (v/v)

検出：UV214nm

ポンプ送液（定圧法）：20bar

【0046】

【表1】

	分離係数 ( $\alpha$ )	
	実施例2のカラム	実施例3のカラム
ラセミ体(a)	1.61	1.47
ラセミ体(b)	1.20	1.07
ラセミ体(c)	1.25	1.26
ラセミ体(d)	1.42	1.36
ラセミ体(e)	1.22	1.17
ラセミ体(f)	1.50	1.55
ラセミ体(g)	1.35	1.31

【0047】

【発明の効果】本発明によると、再現良く、安定性に富むフリットを持った分離用カラムを、簡易に製造することができる。

30

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

識別記号

F I

テマート (参考)

C O 7 B 57/00

3 5 0

C O 7 B 57/00

3 5 0

C O 7 C 33/46

C O 7 C 33/46

39/15

39/15

49/657

49/657

49/92

49/92

C O 7 D 301/32

C O 7 D 301/32

303/04

303/04

303/48

303/48

487/08

487/08

G O 1 N 27/447

G O 1 N 30/88

W

30/88

C O 7 M 7:00

(7)

特開 2 0 0 2 - 3 5 0 4 1 3

// C O 7 M 7:00

G O 1 N 27/26

3 3 1 G

3 1 1 E

(72)発明者 山本 智代  
愛知県春日井市神屋町654-265

(72)発明者 脇田 常希  
三重県多気郡多気町牧245

F ターム(参考) 4C048 AA01 BB02 BB33 CC01 KK07  
UU10 XX03

4C050 AA03 AA07 BB08 CC08 DD10  
EE02 FF02 GG01 HH01

4H006 AA02 AC83 AD17 FC52 FC54  
FE11 FE13 FE71 FE74